

Detecting cells especially in food or drink by adding a material giving rise to an enzyme followed by optical fluorescence examination

Patent Number : DE19841588

International patents classification : C12Q-001/04 C12Q-001/06 G01N-021/64

• Abstract :

DE19841588 A NOVELTY - In a process for detecting cells in a sample, the sample is mixed with a substance which forms a specific enzyme. The presence of the cells is then revealed by optical fluorescence examination (e.g. by adding a fluorescent dye).

USE - Process is used to detect the presence of selected microbiological cells in food or drink especially liquid or liquefied foods e.g. milk, beer, lemonade or fruit juice.

ADVANTAGE - The process provides definitive evidence of the presence or absence of a particular type of cell within one hour, a significant reduction on the prior art (which often took 3-7 days). (Dwg.0/1)

• Publication data :

Patent Family : DE19841588 A1 20000323 DW2000-23 C12Q-001/04 4p * AP: 1998DE-1041588 19980911

WO200015832 A1 20000323 DW2000-23 C12Q-001/06 Ger AP: 1999WO-DE02867 19990909 DSNW: AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZA ZW DSRW: AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW NL OA PT SD SE SL SZ UG ZW AU200011493 A 20000403 DW2000-34 C12Q-001/06 FD: Based on WO200015832 AP: 2000AU-0011493 19990909

EP1119638 A1 20010801 DW2001-44 C12Q-001/06 Ger FD: Based on WO200015832 AP: 1999EP-0969120 19990909; 1999WO-DE02867 19990909 DSR: AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

DE19981818 T 20010927 DW2001-56 C12Q-001/06 FD: Based on WO200015832 AP: 1999DE-1081818 19990909; 1999WO-DE02867 19990909

Priority n° : 1998DE-1041588 19980911

Covered countries : 89

Publications count : 5

• Patentee & Inventor(s) :

Patent assignee : (EGGE/) EGGERS G (NITZ/) NITZSCHE F

Inventor(s) : EGGERS G; NITZSCHE F

• Accession codes :

Accession N° : 2000-257851 [23]

Sec. Acc. n° CPI : C2000-078965

Sec. Acc. n° non-CPI : N2000-191735

• Derwent codes :

Manual code : CPI: A05-E06B A12-W11A A12-W11L

D03-K03 D05-H04 D05-H05 D05-H06 D05-H09

EPI: S03-E04D S03-E14A

Derwent Classes : A89 D13 D16 S03

• Update codes :

Basic update code :2000-23

Equiv. update code :2000-23; 2000-34; 2001-44; 2001-56

Others :

Technology Abstract

TECHNOLOGY FOCUS

BIOTECHNOLOGY - Preferred process: The sample is provided in liquid form and is filtered before the optical fluorescence examination. Preferably the cells are filtered off using a polycarbonate membrane filter. The optical fluorescence examination is performed using a microscope. The cells are preferably treated with an agent which at least partially opens the cell walls.

POLYMERS - A polycarbonate membrane filter is used to filter off the cells before optical fluorescence examination.

UE4

2001-08; 2001-10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑬ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 41 588 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/04
G 01 N 21/64

②① Aktenzeichen: 198 41 588.5
②② Anmeldetag: 11. 9. 1998
④③ Offenlegungstag: 23. 3. 2000

DE 198 41 588 A 1

⑦① Anmelder:
Nitzsche, Frank, Dr., 46562 Voerde, DE; Eggers,
Guido, 45133 Essen, DE

⑦④ Vertreter:
Castell, K., Dipl.-Ing. Univ. Dr.-Ing.; Reuther, M.,
Dipl.-Phys., Pat.-Anw., 52349 Düren

⑦② Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

⑤⑤ Entgegenhaltungen:
DE 38 55 762 T2
DE 38 52 825 T2
US 42 42 447 A
WO 96 14 431 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zum Nachweis von Zellen in einer Probe

⑤⑦ Bei dem Verfahren zum Nachweis von Zellen wird einer Probe ein Stoff zugesetzt, der bei aktiven Zellen zur Bildung eines bestimmten Enzyms führt. Anschließend werden die Zellen im Mikroskop fluoreszenzoptisch untersucht. Im mikroskopischen Bild leuchten die Zellen, die über die gesuchte Enzymaktivität verfügen, dem Fluoreszenzstoff entsprechend auf.
Das Verfahren ermöglicht einen sehr schnellen Nachweis der vermehrungsfähigen Zellen.

DE 198 41 588 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Zellen in einer Probe.

Bei der Durchführung biotechnologischer Prozesse, die mit speziellen Mikroorganismen durchgeführt werden, müssen die Zwischenprodukte und die Endprodukte auf ihre mikrobiologische Reinheit überprüft werden. Bei dieser Kontrolle wird geprüft, wieviele und welche Mikroorganismen pro Volumeneinheit im Zwischen- oder Endprodukt vorhanden sind. Hierbei sind vor allem die vermehrungsfähigen Mikroorganismen von Bedeutung, die eine Kontamination des Zwischen- oder Endproduktes hervorrufen können.

Heutzutage werden aus den Zwischen- und Endprodukten Proben entnommen und mit Hilfe der klassischen mikrobiologischen Verfahren auf das Vorhandensein erwünschter oder unerwünschter Mikroorganismen untersucht. Zum Nachweis dient die Membranfiltration, bei der die Probe durch eine Membran gezogen wird, die so fein ist, daß die Mikroorganismen auf der Membran verbleiben. Auf der Membran werden die Mikroorganismen vermehrt, so daß ihre Kolonien mit dem bloßen Auge sichtbar werden. Bei einem anderen Verfahren wird die Probe mit Nährboden angereichert und nach einer Standzeit die Verfärbung des Nährbodens analysiert. Weitere Verfahren sind die Standprobe und teilweise die PCR.

Alle diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, daß die Behandlung der Probe aufwendig ist und erst frühestens nach mehreren Tagen das Ergebnis bekannt ist.

Eine direkte Betrachtung der Probe unter dem Mikroskop führt nur bei einer extremen Keimbelastung zu einem Ergebnis. Die üblichen relativ geringen Keimbelastungen sind jedoch erst nach einer Anreicherung und einer anschließenden Bebrütung über drei bis sieben Tage aussagekräftig zu analysieren.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem ein weit schnellerer Nachweis von Zellen in einer Probe und insbesondere der Nachweis von vermehrungsfähigen Zellen möglich ist.

Diese Aufgabe wird mit einem Verfahren gelöst, bei dem der Probe ein Stoff zugesetzt wird, der bei aktiven Zellen zur Bildung eines bestimmten Enzyms führt, und die Zellen anschließend fluoreszenzoptisch untersucht werden.

Der Erfindung liegt die Erkenntnis zugrunde, daß an der Bildung eines vorher noch nicht vorhandenen Enzyms die Aktivität der Zelle überprüft werden kann. Erst wenn ein der Probe zugesetzter Stoff in einer Zelle zur Bildung des Enzyms führt, ist sichergestellt, daß in dieser Zelle der Stoffwechselweg von der Induktion zur Bildung eines Enzyms durch die Aufnahme einer spezifischen Substanz, über das Ablesen der notwendigen Erbinformation auf der DNS, dem Übersetzen der Information in die entsprechende m-RNS unter Bildung des Enzyms an den Ribosomen funktioniert. Damit kann diesen Zellen ein funktionsfähiger Stoffwechsel und damit auch eine mögliche Vermehrungsfähigkeit zugeschrieben werden.

Der Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß diese Untersuchung an einer einzelnen Zelle durchgeführt werden kann. Die gezogene Probe muß daher nicht wie bei der klassischen Mikrobiologie zunächst angereichert oder vermehrt werden, um anschließend eine Zellpopulation zu untersuchen. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Probe direkt untersucht und das Verfahren erlaubt schon nach einer Stunde eine Aussage über die Enzymbildungsfähigkeit einer Zelle in der Probe.

Vorteilhaft ist es, wenn die Probe in flüssiger Form vorliegt und die Zellen vor der fluoreszenzoptischen Untersuchung abfiltriert werden. Dies ermöglicht es, die Probe zu-

nächst nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zu behandeln und anschließend die Zellen aus der flüssigen Probe herauszufiltrieren und zu untersuchen.

Zur Trennung der Zellen von der Probe wird vorteilhafterweise ein Membranfilter, vorzugsweise ein Polykarbonatfilter, verwendet. Diese Filter sind besonders gut geeignet, über die Wahl einer entsprechenden Porengröße den gesuchten Mikroorganismus abzufiltrieren.

Die behandelten Zellen, die vorzugsweise auf einer Filtermembran vorliegen, können anschließend mit Hilfe eines Mikroskopes fluoreszenzoptisch untersucht werden. Im mikroskopischen Bild leuchten die Zellen, die über die gesuchte Enzymaktivität verfügen, dem Fluoreszenzfarbstoff entsprechend auf.

Eine vorteilhafte Ausgestaltung sieht vor, daß den Zellen eine Substanz zugegeben wird, die die Zellwände zumindest stellenweise öffnet. Dadurch wird der Zutritt des Inducers des gesuchten Enzyms und des Fluoreszenzfarbstoffes in die Zelle erleichtert.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich vor allem für Lebensmittelproben. Hierbei ist es günstig, wenn die Probe ein flüssiges oder verflüssigtes Lebensmittel ist. Insbesondere für die Untersuchung von Getränken, wie vorzugsweise Bier oder alkoholfreien Getränken ist das Verfahren besonders geeignet.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung ist in der Figur dargestellt und wird im Folgenden näher erläutert.

Der erste Verfahrensschritt liegt darin, das zu untersuchende Probematerial in eine flüssige, wässrige Form zu überführen. Wenn Lebensmittel, wie beispielsweise Käse oder Marmelade untersucht werden sollen, müssen diese Stoffe auf geeignete Weise verflüssigt werden. In der Figur ist der zu untersuchende Stoff mit der Bezugsziffer 1 bezeichnet. Die im Erlenmeierkolben vorliegende wässrige Form des zu untersuchenden Probematerials hat die Bezugsziffer 2. Wenn die Probe ein Getränk ist, erübrigt sich die Zugabe des Probematerials, da die Probe 2 schon in flüssiger Form vorliegt.

Zu dieser Probe wird der Inducer 3 des gesuchten Enzyms zugesetzt. Um z. B. Lactobazillen nachzuweisen, wird ein Inducer für Galactosidase, z. B. Galactose, zugesetzt.

Außerdem wird der Probe 2 ein Fluoreszenzfarbstoff 4 zugegeben. Zum Nachweis von Lactobazillen wird ein für die Galactosidase spezifisches Reagenz wie Fluoresceindilactosid zugegeben.

Letztlich kann auch anschließend oder gleichzeitig eine Substanz 5 zugesetzt werden, die Zellwände der gesuchten Mikroorganismen an verschiedenen Stellen öffnet. Als zellwandöffnende Substanz kann beispielsweise Mutanolysin verwendet werden. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, zellwandgängige Substanzen zu verwenden, die ohne Aufschluß die Zellwand passieren können.

Nach einer dem Substrat entsprechenden Einwirkzeit und Einwirktemperatur wird die Probe über einen Polykarbonatmembranfilter 6 mit einer dem gesuchten Mikroorganismus entsprechenden Porengröße filtriert. Die Probe gelangt dabei in den Auffangbehälter 7 und die gesuchten Mikroorganismen verbleiben auf dem Membranfilter 8.

Der Membranfilter 8 wird anschließend fluoreszenzoptisch untersucht. Dies wird mit Hilfe eines Mikroskops 9 durchgeführt. Im mikroskopischen Bild 10 leuchten die Zellen, die über die gesuchte Enzymaktivität verfügen, dem Fluoreszenzfarbstoff entsprechend auf.

Aus der Anzahl der Leuchtpunkte oder der Intensität der Leuchtkraft kann auf einfache Weise auf die Kontamination der Probe mit vermehrungsfähigen Lactobazillen zurückgeschlossen werden. Das Ergebnis berücksichtigt sowohl die Anzahl der Mikroorganismen pro Probevolumen als auch

die Enzymaktivität und somit Vermehrungsfähigkeit der gefundenen Zellen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Zellen in einer Probe (2), bei dem der Probe (2) ein Stoff (3) zugesetzt wird, der bei aktiven Zellen zur Bildung eines bestimmten Enzyms führt, und die Zellen anschließend fluoreszenzoptisch untersucht werden. 5
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe (2) in flüssiger Form vorliegt und die Zellen vor der fluoreszenzoptischen Untersuchung abfiltriert werden. 10
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen mit einem Membranfilter (6), vorzugsweise einem Polykarbonatfilter, abfiltriert werden. 15
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen mit Hilfe eines Mikroskops (9) fluoreszenzoptisch untersucht werden. 20
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß den Zellen eine Substanz (5) zugegeben wird, die die Zellwände zumindest stellenweise öffnet. 25
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe (1, 2) ein Lebensmittel ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe (2) ein flüssiges oder verflüssigtes Lebensmittel ist. 30
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe (2) ein Getränk, vorzugsweise Bier oder ein alkoholfreies Getränk wie etwa Milch, Limonade oder Fruchtsaft ist. 35

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

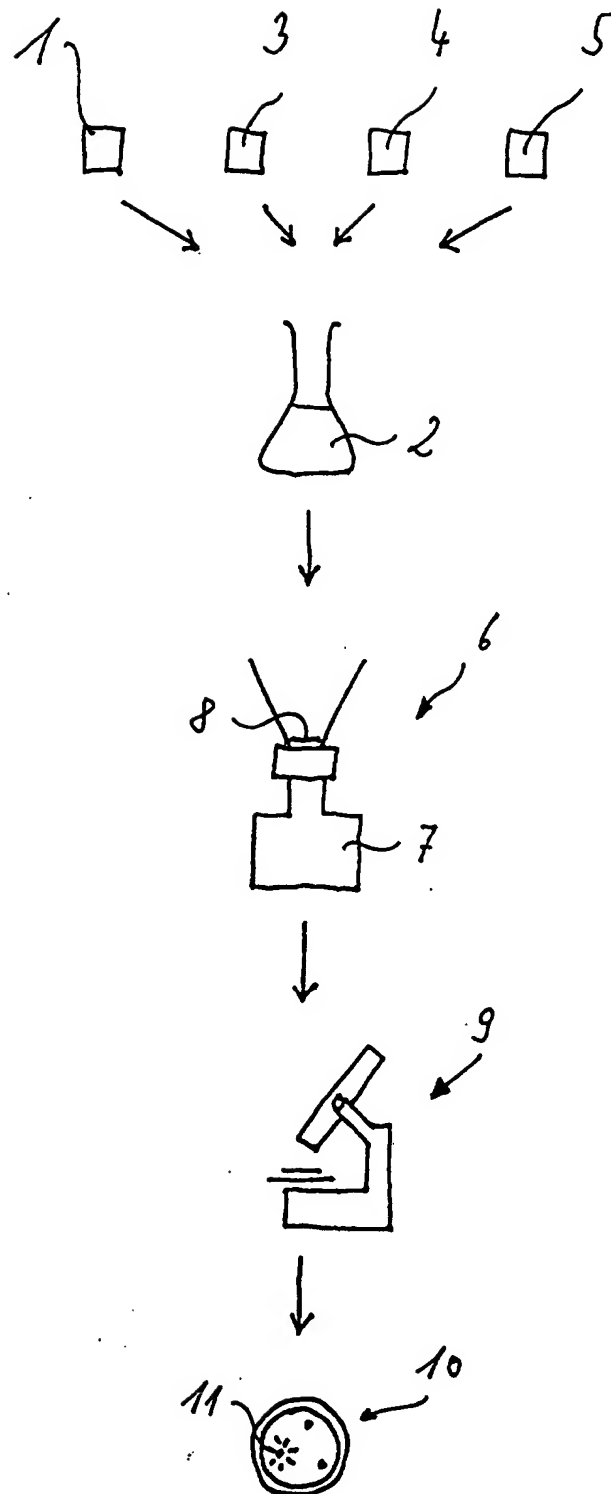


Fig.